10.22092/sppi.2020.121932

مجله به‌نژادی نهال و بذر
جلد ۱-۳۵، شماره ۲، سال ۱۳۹۸

مقاله کوتاه علمی

Scientific Short Article

امکان استفاده از مارچوبه ایرانی (*Asparagus persicus*) در برنامه‌های به‌نژادی

The Possibility of Using Iranian Asparagus (*Asparagus persicus*) in Breeding Programs

محمدابراهیم رنجبر[۱]، زهرا قهرمانی[۲]، سید جواد موسوی‌زاده[۳]، طاهر برزگر[۴] و خوان خیل[۵]

۱، ۲ و ۴- به ترتیب دانشجوی دکتری، استادیار و دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.
۳- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۵- استاد گروه ژنتیک، دانشکده ژنتیک، دانشگاه کوردوبا، کوردوبا، اسپانیا.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۳/۱۸ **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۵/۱۵**

رنجبر، م. ا.، قهرمانی، ز.، موسوی زاده، س. ج.، برزگر، ط. و خیل، خ. ۱۳۹۸. امکان استفاده از مارچوبه ایرانی(*Asparagus persicus*) در برنامه‌های به نژادی. **مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۳۲: ۲۴۹ - ۲۴۱.**

مهمترین گونه تجاری مارچوبه *A. officinalis* است. در میان گونه های وحشی مارچوبه، گونه *A. persicus* به عنوان مارچوبه ایرانی شناخته می‌شود که توانایی رشد در شرایط سخت محیطی مانند دمای بالا و خاک‌های شور و خشک را دارد، بنابراین می‌تواند گزینه مناسبی برای برنامه‌های به نژادی از طریق تلاقی بین‌گونه‌ای باشد (Mousavizadeh *et al.*, 2015).

تلاقی بین‌گونه‌ای روش پرکاربرد برای انتقال صفات از گونه‌های وحشی به ارقام تجاری است (Nothnagel *et al.*, 2012). اولین گزارش از تلاقی بین‌گونه‌ای در مارچوبه در سال ۱۹۱۳ میلادی منتشر شد که با هدف تولید هیبریدهای مقاوم به بیماری زنگ مارچوبه انجام شد (Norton, 1913).

از مزایای استفاده از نشانگرهای ملکولی می‌توان به تعداد نامحدود، تشخیص آسان، تولید چندشکلی بالا و تأثیرناپذیری از عوامل محیطی اشاره کرد. کاربرد موفق ۲۳ نشانگر RAPD، در جهت شناسایی نتاج هیبرید حاصل از تلاقی گونه‌های *A. acutifolius* و *A. maritimus* با رقم تجاری مارچوبه گزارش شده است (Valente *et al.*, 2012).

نگارنده مسئول: z.ghahremani@znu.ac.ir تلفن: ۰۲۴۳۳۰۵۴۵۲۸

اهداف پژوهش حاضر، بررسی امکان تلاقی بین گونه *A. persicus* با رقم تجاری مارچوبه (*Asparagus officianalis L.*)، شناسایی نشانگرهای ملکولی مناسب جهت تشخیص گیاهان هیبرید حاصل از گرده‌افشانی آزاد و شناسایی نشانگرهای ملکولی با توانایی تشخیص آلل اختصاصی در گونه *A. persicus* می‌باشد. به این منظور پژوهشی در سال‌های ۱۳۹۶ تا ۱۳۹۸ در دانشگاه کوردوبا اسپانیا انجام شد. بیست و یک توده مختلف مارچوبه با سطوح دیپلوئید (2x) تا دودکاپلوئید (12x) از شش کشور مختلف مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱).

در این پژوهش از دو روش تلاقی دستی و گرده‌افشانی آزاد به منظور تولید هیبرید بین گونه‌ای استفاده شد:

الف) تلاقی دستی: گیاهان مادری از طریق کشت بذر در شرایط گلخانه پرورش داده شدند. تلاقی *A. persicus* (APe) × (AU) *A. officinalis* در سطح پلوئیدی یکسان (2*x*) و به‌صورت دستی در شرایط عاری از حشرات گرده‌افشان انجام شد. میوه‌های تشکیل شده روی پایه‌های ماده جمع‌آوری شده و بذر با محلول پنج درصد هیپوکلریدسدیم ضدعفونی شدند. سپس اقدام به کشت آن‌ها در اتاقک رشد (دمای ۲۷°C) گردید.

به‌منظور اطمینان از ماهیت هیبریدی نتاج (چون در مارچوبه حالت چندجنینی و شکل‌گیری جنین‌های غیرجنسی وجود دارد) از روش یافتن آلل‌های اختصاصی والدین در نتاج استفاده شد. بدین منظور از ۲۰ جفت نشانگر EST-SSR (TC1، TC2، TC3، TC4، TC5، TC6، TC7، TC8، TC9، AGA1، AAT1، AG2، AG3، AG5، AG6، AG7، AG8، AG10، AG11 و AG12) طراحی‌شده برای رقم تجاری مارچوبه استفاده شد (Caruso *et al.*, 2008).

استخراج DNA مواد گیاهی از یک گرم از انتهای اسپیرهای جوان با استفاده از روش تغییریافته دویل و دویل انجام شد (Doyle and Doyle, 1987). کمیت و کیفیت DNA به وسیله نانودراپ اسپکتوفتومتری (ND-1000; Thermo Scientific, Waltham, MA) تعیین گردید. واکنش PCR بر مبنای پژوهش کروسو و همکاران (Caruso *et al.*, 2008) صورت پذیرفت. محصول PCR با کاربرد یک توالی‌سنج مویین اتوماتیک (ABI 3130 Genetic Analyzer; Applied Biosystems/Hitachi, Madrid, Spain) جداسازی شد. اندازه باندهای تشکیل شده بر اساس DNA استاندارد با نرم‌افزار GeneScan محاسبه شده و نتایج به وسیله نرم‌افزار Genotyper ترجمه شد.

ب) گرده‌افشانی آزاد: در این روش در فصل بهار پایه‌های نر گونه *A. persicus* حذف و به پایه‌های ماده این گونه اجازه دریافت دانه گرده از پایه‌های نر سایر توده‌ها (جدول ۱) توسط گرده‌افشان‌های طبیعی داده شد. پس از پایان

جدول ۱- برخی از ویژگی‌های گونه‌ها و نمونه‌های ژنتیکی مارچوبه

Table 1. Some characteristics of species and accessions of asparagus

Region & Climate منطقه و اقلیم	Origin منشاء	Type نوع	سطح پلوئیدی Ploidy level	کد Code	گونه Species
ولگا - سرد و مرطوب Volga – Cold wet	روسیه Russia	رقم تجاری Commercial cultivar	2x	WR	*A. officinalis* L.
اردبیل– سرد و نیمه خشک Ardabil – Cold semi-arid	ایران Iran	توده وحشی Wild accession	2x	AV1	*A. verticillatus* L.
سمنان (شاهرود)– مدیترانه‌ای Semnan (Shahrood)- Mediterranean	ایران Iran	توده وحشی Wild accession	2x	AV2	*A. verticillatus* L.
گیلان (لاهیجان)- سرد و مرطوب Guilan (Lahijan)- Cold wet	ایران Iran	توده وحشی Wild accession	2x	AV3	*A. verticillatus* L.
کرمان- بیابانی Kerman- Desert	ایران Iran	توده وحشی Wild accession	2x	AO4	*A. officinalis* L.
البرز – مدیترانه‌ای سرد Alborz- Cold mediterranean	ایران Iran	توده اهلی شده Domesticated accession	2x	AO6	*A. officinalis* L.
گیلان (منجیل) – مدیترانه‌ای Guilan (Manjil)- Mediterranean	ایران Iran	گونه وحشی Wild species	2x	APe	*A. persicus* Baker.
رقم مری واشنگتن Mary Washington cultivar	آمریکا America	رقم تجاری Commercial cultivar	2x	AU	*A. officinalis* L.
لاکرونیا– مدیترانه‌ای معتدل La Coruna- Temperate Mediterranean	اسپانیا Spain	گونه وحشی Wild species	4x	APB	*A. prostratus* Dumort.
مازندران (محمودآباد) – گرم و مرطوب Mazandaran (Mahmoodabad)- Warm temperate	ایران Iran	توده وحشی Wild accession	4x	AO2	*A. officinalis* L.

Table 2. Continued

ادامه جدول ۲-

Region & Climate منطقه و اقلیم	Origin منشاء	Type نوع	سطح پلوئیدی Ploidy level	کد Code	گونه Species
البرز (طالقان)-مدیترانه‌ای سرد Alborz (Taleghan)- Cold Mediterranean	ایران Iran	توده وحشی Wild accession	4x	AO1	*A. officinalis* L.
کوردوبا– مدیترانه‌ای گرم Cordoba- Warm Mediterranean	اسپانیا Spain	گونه وحشی Wild species	4x	AC	*A. acutifolius* L.
گرانادا– مدیترانه‌ای گرم Granada- Warm Mediterranean	اسپانیا Spain	توده تجاری Commercial accession	4x	HT	*A. officinalis* , Morado de Huétor
ولگا – سرد و مرطوب Volga – Cold wet	روسیه Russia	گونه وحشی Wild species	6x	AB	*A. brachyphyllus* Turz.
موراویای– اقیانوسی مرطوب Morava- Oceanic wet	جمهوری چک Czech Republic	گونه وحشی Wild species	6x	APS	*A. pseudoscaber* Grec.
ولوره– معتدل و مرطوب Velora- Temperate wet	آلبانی Albania	گونه وحشی Wild species	6x	MA	*A. maritimus* L. Mill.
مازندران (نور) – سرد و مرطوب Mazandaran (Noor) - Cold wet	ایران Iran	توده وحشی Wild accession	8x	AO3	*A. officinalis* L.
مازندران (آمل)- مدیترانه‌ای نیمه مرطوب Mazandaran (Amol)- Semi-humid Mediterranean	ایران Iran	توده وحشی Wild accession	8x	AO7	*A. officinalis* L.
سمنان (یزدو) – گرم و خشک Semnan (Yazdoo)- Warm & dry	ایران Iran	گونه وحشی Wild species	8x	Abr	*A. breslerianus* Schult.
کردستان – سرد و خشک Kurdestan - Cold & dry	ایران Iran	توده وحشی Wild accession	10x	AO5	*A. officinalis* L.
کارتاگنا – گرم مدیترانه‌ای Cartagena- Warm Mediterranean	اسپانیا Spain	گونه وحشی Wild species	12x	MC	*A. macrorrhizus* Pedrol

دوره گرده‌افشانی اقدام به جمع‌آوری بذر از پایه‌های ماده گونه *A. persicus* و کشت آنها شد.

به منظور تشخیص نتاج هیبرید از روش بررسی الگوهای چندشکلی استفاده شد. بدین منظور از سه مجموعه نشانگر استفاده شد که شامل دسته اول: ۲۰ جفت نشانگر EST-SSR طراحی شده برای گونه تجاری مارچوبه (Caruso *et al.*, 2008)، دسته دوم: ۲۰ جفت نشانگر SSR (ACM009، ACM024، ACM033، ACM061، ACM063، ACM066، ACM091، ACM093، ACM094، ACM099، ACM101، ACM112، ACM115، ACM125، ACM132، ACM138، ACM146، ACM154، ACM171 و ACM177) طراحی شده برای پیاز (Kuhl *et al.*, 2004) و دسته سوم: سه جفت نشانگر ISSR (AA01، AA02 و AA03) طراحی شده برای گونه *A. acutifolius* (Sica *et al.*, 2005) بود.

از ۱۰ گیاه مختلف با جنسیت‌های متفاوت برای هر گونه، DNA ژنومی استخراج و از ترکیب آن به عنوان نمونه ژنومی برای هر گونه در واکنش PCR استفاده شد. واکنش PCR بر مبنای پژوهش کروسو و همکاران (Caruso *et al.*, 2008) انجام شد. الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲/۵ درصد در بافر TBE انجام شد و به‌وسیله محلول رد سیف (*Red Safe*) باندهای تولید شده مورد رنگ‌آمیزی قرار گرفت. الگوهای چندشکلی تولید شده به کمک اشعه فرابنفش و روش عکسبرداری قابل مشاهده شدند.

سه نوع از الگوهای چندشکلی تولید شده مطلوب و پرکاربرد در نظر گرفته شدند: ۱) الگوهایی که در آن‌ها بین باند تولید شده برای گونه *A. persicus* و سایر گونه‌ها تفاوت اندازه واضح وجود داشته باشد. ۲) الگوهایی که در آن‌ها برای تمامی توده‌های مورد مطالعه به استثنای گونه *A. persicus* تولید باند شده باشد. ۳) الگوهایی که در آن‌ها فقط در گونه *A. persicus* تولید باند شده باشد و برای سایر توده‌های مورد مطالعه باندی شکل نگرفته باشد. پس از شناسایی نتاج هیبرید، درصد هیبریداسیون برای گونه *A. persicus* به کمک فرمول زیر محاسبه شد (Morais *et al.*, 2016).

۱۰۰ × تعداد کل گیاهان مورد بررسی / تعداد گیاهان هیبرید = درصد هیبریداسیون

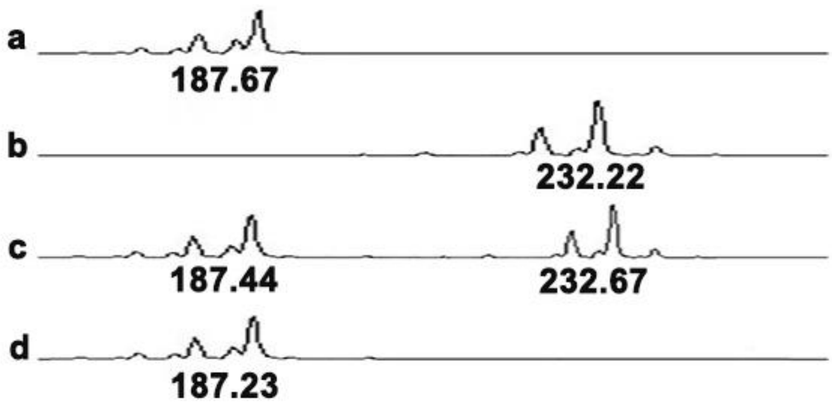
تشخیص والد نر برای نتاج هیبرید حاصل از گرده‌افشانی آزاد در طی دو مرحله صورت پذیرفت: ۱) برآورد سطح پلوئیدی والد نر (Moreno *et al.*, 2006). در این شرایط با دانستن سطح پلوئیدی والد ماده (*A. persicus*) و نتاج هیبرید، سطح پلوئیدی والد نر تعیین شد

و توده‌هایی که در سطح پلوئیدی مشخص شده نبودند از روند بررسی به عنوان والد نر حذف شدند. ۲) تعیین دقیق والد نر به کمک نشانگرهای ملکولی با توانایی تشخیص آلل اختصاصی.

نتایج حاصل از تلاقی دستی: امکان تلاقی موفق بین‌گونه‌ای *A. officinalis* × *A. persicus* به منظور انتقال صفات از گونه خودرو *A. persicus* به گونه تجاری *A. officinalis* وجود داشت. همچنین نتایج حاصل از بررسی الگوهای چندشکلی و توالی‌یابی نشان داد که نشانگر AG8 توانایی تشخیص آلل اختصاصی به طول bp ۲۳۲ را در گونه *A. persicus* و آللی اختصاصی به طول ۱۸۷bp را در گونه *A. officinalis* داشت. چهار گیاه از مجموع نتاج حاصل از تلاقی دستی دارای هر دو آلل اختصاصی بودند که این موضوع بیانگر شکل‌گیری ژنوم این نتاج از ترکیبی از ژنوم گونه وحشی و تجاری بود. شکل ۱ نتیجه حاصل از توالی‌یابی برای نتاج هیبرید و غیرهیبرید را نشان می‌دهد. با توجه به احتمال شکل‌گیری جنین‌های غیرجنسی در مارچوبه، احتمال بروز خطا در گرده‌افشانی دستی، احتمال گرده‌افشانی پایه ماده با گرده‌افشان‌های طبیعی و تأثیرپذیری زیاد نشانگرهای مورفولوژیکی از شرایط محیطی انجام این امر ضروری است (Kanno and Yokoyama, 2011).

نتایج حاصل از گرده‌افشانی آزاد: نشانگر TC6 الگوی چندشکلی مطلوبی را برای تشخیص نتاج هیبرید حاصل از گرده‌افشانی آزاد تولید کرد. در مورد این نشانگر الگوی نوع اول مشاهده گردید. در این الگو، برای گونه *A. persicus* باندی تقویت شد که دارای اختلاف اندازه مشهود و قابل تشخیص با سایر باندهای تولید شده برای توده‌های دیگر بود (شکل ۲A). همچنین به منظور تأیید نتایج حاصل شده واکنش PCR دیگری پایه‌ریزی گردید. بر اساس شکل ۲B، در این بخش از ترکیب ژنوم ۱۰ گیاه برای گونه *A. persicus* (APe)، ترکیب ژنوم ۱۰ گیاه برای گونه *A. officinalis* (AO6)، چهار گیاه هیبرید بین‌گونه‌ای حاصل از تلاقی دستی که یکی از والدین آن‌ها گونه *A. persicus* بود و اصالت هیبریدی آن‌ها از قبل به کمک تشخیص آلل‌های اختصاصی والدین در نتاج تایید شده بود (AP1، AP2، AP3 و AA1) و ۱۲ گیاه حاصل از گرده‌افشانی آزاد (12-1) استفاده شد. همانطور که انتظار می‌رفت نشانگر TC6 برای ترکیب ۱۰ گیاه گونه *A. persicus* تشکیل یک باند، برای ترکیب ۱۰ گیاه *A. officinalis* تشکیل یک باند و برای هیبریدهای حاصل از تلاقی دستی تشکیل دو باند داد و از بین ۱۲ گیاه حاصل از گرده‌افشانی آزاد تعداد نه گیاه را هیبرید بین‌گونه‌ای تشخیص داد.

در مجموع تعداد ۴۴ گیاه، حاصل از گرده‌افشانی آزاد به کمک نشانگر TC6 مورد بررسی قرار گرفت و ۱۵ گیاه به عنوان نتاج

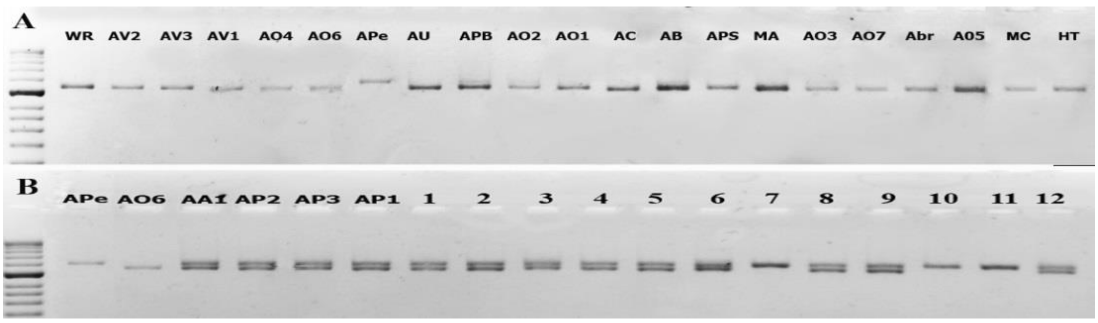


شکل ۱- نتایج حاصل از بکارگیری مارکر AG8 برای تلاقی *A. officinalis* × *A. persicus*

a) والد ماده هموزیگوت *A. officinalis*، b) والد نر هموزیگوت *A. persicus*، c) تایید ماهیت هیبریدی گیاه F1 حاوی هر دو آلل والدینی (هتروزیگوت) و d) ماهیت غیرهیبریدی گیاه F_1 فقط حاوی آلل والد ماده (هموزیگوت).

Fig. 1. Results of employing AG8 marker for *A. officinalis* × *A. persicus* cross

a) homozygote female parent *A. officinalis* , b) homozygote male parent *A. persicus* , c) Confirmation of the hybrid nature of F1 plant containing both parental alleles (heterozygote) and d) Non-hybrid nature of F1 plant only contains female parent allele (homozygote).



شکل ۲- الگوی چندشکلی برای نشانگر TC6 (A), آزمون تایید عملکرد بهینه نشانگر TC6 (B)

Fig. 2. Polymorphic pattern for TC6 marker (A), and optimized performance test of TC6 marker (B)

هیبرید بین‌گونه‌ای تشخیص داده شد. با توجه به این موضوع درصد هیبریداسیون برای گونه *A. persicus* میزان ۳۴/۰۹ درصد ارزیابی گردید. نتایج حاصل از بررسی سطح پلوئیدی نتاج هیبرید حاصل از گرده‌افشانی آزاد نشان داد که تمامی هیبریدا دیپلوئید بودند و این موضوع به این معنا است که با توجه به دیپلوئید بودن والد ماده (*A. persicus*)، سطح پلوئیدی والد نر نیز دیپلوئید است. به استثنای گونه *A. persicus*، گونه‌های *A. officinalis* و *A. verticillatus* نیز دیپلوئید هستند. بنابراین والد نر برای ۱۵ هیبرید به دست آمده در این پژوهش، یکی از این دو

گونه بود که با تشخیص آلل اختصاصی توسط نشانگرهای AG8 و TC9 قابل شناسایی بودند.

نتایج حاصل از بررسی الگوهای چندشکلی و توالی‌یابی نشان داد که نشانگر TC9 توانایی تشخیص آلل اختصاصی در گونه *A. verticillatus* و نشانگر AG8 توانایی شناسایی آلل‌های اختصاصی در توده‌ها و ارقام مختلف گونه *A. officinalis* را دارا می‌باشد. والد نر در پنج هیبرید، توده خودرو *A. officinalis* (AO4) و در ۱۰ هیبرید دیگر، رقم تجاری مارچوبه از کشور آمریکا (AU) بود. نتایج حاصل از بکارگیری نشانگرهای طراحی شده برای گیاه پیاز در نمونه‌های ژنتیکی مارچوبه نشان داد که نشانگر ACM101 توانایی شناسایی مکان‌های ژنی در نمونه‌های مورد بررسی مارچوبه اعم از گونه *A. persicus* را دارد. در مقابل سه نشانگر طراحی شده برای گونه *A. acutifolius* تنها برای همین گونه تولید باند کرد و برای سایر توده‌ها باندی تشکیل نشد.

واژه‌های کلیدی: مارچوبه ایرانی، تلاقی بین گونه‌های،گونه‌ای وحشی، نشانگرهای SSR.

References

Caruso, M., Federici, C. T., and Roose, M. L. 2008. EST-SSR markers for asparagus genetic diversity evaluation and cultivar identification. Molecular Breeding 21: 195-204.

Doyle, J. J., and Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.

Kanno, A., and Yokoyama, J. 2011. Asparagus. pp. 23-42. In: Chittaranjan, K. (ed.) Wild crop relatives: genomic and breeding resources. Springer.

Kuhl, J. C., Cheung, F., Yuan, Q., Martin, W., Zewdie, Y., McCallum, J., Catanach, A., Rutherford, P., Sink, K. C., Jenderek, M., Prince, J. P., Town, C. D., and Havey, M. J. 2004. A unique set of 11,008 onion (*Allium cepa*) ESTs reveals expressed sequence and genomic differences between monocot orders Asparagales and Poales. Plant Cell 16: 114-125.

Morais, S., Vieira, A., Almeida, L., Rodrigues, L., Melo, P., Faria, L., Melo, L., Pereira, H., and Souza, T. 2016. Application of microsatellite markers to confirm controlled crosses and assess genetic identity in common bean. Crop Breeding and Applied Biotechnology 16: 234-239.

Moreno, R., Espejo, J., A., Cabrera, A., Millan, T., and Gil, J. 2006. Ploidic and molecular analysis of 'Morado de Huetor' asparagus (*Asparagus officinalis* L.) population; a Spanish tetraploid landrace. Genetic Resources and Crop Evolution 53 (4): 729-736.

Mousavizadeh, S. J., Hassandokht, M. R., and Kashi, A. 2015. Multivariate analysis of edible asparagus species in Iran by morphological characters. Euphytica 206: 445-457.

Norton, J. B .1913. Methods used in breeding asparagus for rust resistance. United State Department of Agriculture, Bureau of Plant Industry. Bulletin No. 263. 84 pp.

Nothnagel, T., Kramer, R., Budahn, H., Schrader, O., Ulrich, D., Rabenstein, F., and Schreyer, L. 2012. Enlargement of the genetic variability of garden Asparagus (*Asparagus officinalis* L.) to improve resistance to biotic and abiotic stresses and quality associated compounds. Acta Horticulturae 950: 143-151

Sica, M., Gamba, G., Montieri, S., Gaudio, L., and Aceto, S. 2005. ISSR markers show differentiation among Italian populations of *Asparagus acutifolius* L. BMC Genetics 6: 17.

Valente, M. T., Sabatini, E., Casali, P. E., and Falavigna, A. 2012. Molecular marker assisted introgression of wild asparagus species genome into the cultivated *Asparagus officinalis*. Acta Horticulturae 950: 181-186.